Sabouraudia (1973), **11,** 80-88

ANALISIS INMUNOQUIMICO DE EXTRACTOS SOLUBLES DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

L. A. Yarzábal*†, J. Biguet**, Therèse Vaucelle**, Suzanne Andrieu**, J. M. Torres*, y Silvia Da Luz*.

**Laboratorio de Inmunología Parasitaria, Hospital de Clínicas – Facultad de Medicina Montevideo, Uruguay.*

***Laboratoire de Parasitologie, UER de Pharmacie et de Médecine, Unité d'Immunologie Parasitaire Inserm (U.42), Lille, France.*

La electroforesis de extractos solubles obtenidos de 9 cepas de *Paracoccidioides brasiliensis,* practicada sobre gel de agar, a pH alcalino, permitió individualizar claramente 8 fracciones proteicas. Cinco de ellas migraron hacia el ánodo, en tanto que las otras tres se desplazaron hacia el cátodo. El estudio químico de los electroforegramas realizados demostró la existencia de 15 enzimas. Sólo seis de ellas fueron luego identificadas en los inmunoelectroforegramas.

El análisis inmunoelectroforético de los extractos con sueros hiperinmunes preparados en conejos, confirmó que *P. brasiliensis* posee, como mínimo, 25 fracciones antigénicas. Una de ellas, de movilidad catódica y portadora de la actividad fosfatasa alcalina, reaccionó con todos los sueros inmunes empleados, dando origen a un sistema antígeno-anticuerpo característico, que configuró un arco mayor en los diagramas. El anticuerpo correspondiente a esta fracción se formó precozmente en el curso de la infección experimental de animales de laboratorio, así como durante la inmunización de conejos. Se postula que es el antígeno involucrado en la formación del arco E, considerado específico en el inmunodiagnóstico de la paracoccidioidomicosis humana.

Se comprobó la existencia de varias fracciones antigénicas comunes entre *P. brasiliensis* y especies del género *Emmonsia.*

El empleo del análisis inmunoelectroforético, recomendado por Biguet *et al,* (1965) para estudiar la estructura antigénica de los hongos, ha perfeccionado notablemente el diagnóstico inmunológico de diversas micosis, particularmente en aquellos casos en que condujo a la identificación de fracciones específicas del agente. Su aplicación al análisis de extractos solubles de *P. brasiliensis* (Andrieu *et al,* 1969; Yarzábal, 1971) ha permitido confirmar observaciones de Gardini (1966), demostrando que el agente de la paracoccidioidomicosis (= blastomicosis sudamericana) comparte varias fracciones antigénicas con *Histoplasma capsulatum, H. duboisii* y *Blastomyces dermatitidis.* Los mismos trabajos indican, sin embargo, que *P. brasiliensis* puede ser claramente diferenciado, desde el punto de vista inmunoquímico, de las 3 especies referidas.

Ante tales evidencias, y teniendo en cuenta que los antígenos pueden dar origen a reacciones inmunológicas cruzadas, la identificación, y el eventual aislamiento de las fracciones específicas de paracoccidioides, adquiere particular interés.

En tal sentido, la información obtenida estudiando extractos solubles de *P. brasiliensis, H. capsulatum* y *B. dermatitidis,* mediante sueros de casos humanos de paracoccidioidomicosis (Yarzábal, 1971) ha puesto en evidencia que algunas de las fracciones específicas del primero migran hacia el cátodo cuando son sometidas a la acción de un campo eléctrico a pH alcalino. Una de esas fracciones, revelada por

†Present Address: Instituto Bacteriologico de Chile, Av. Marathon 1000, Casilla 48, Santiago, Chile.



todos los sueros humanos reactivos en inmunoelectroforesis, dio origen a un sistema precipitante característico, denominado arco E por el autor.

Investigaciones posteriores (Yarzábal *et al*, 1971) han demostrado que el antígeno responsable de ese arco inmunoelectroforético, aparentemente específico de *P. brasiliensis*, es portador de actividad enzimática fosfatasa alcalina.

Este trabajo, basado en el estudio de 9 cepas de *P. brasiliensis*, aporta 9 precisiones al conocimiento de su composición antigénica, informando sobre la identificación de múltiples actividades enzimáticas en sus extractos, y sobre la formación de anticuerpos precipitantes en la paracoccidioidomicosis experimental y humana.

Materiales y Metodos

Cepas

Se emplearon 9 cepas de *P. brasiliensis*. Ocho de ellas (IHM*724, IHM 891, IHM 1437, IHM 1440, IHM 1529, IHM 1572 y CBS**), eran cultivos de colección. Una (LIP*** 70.159) había sido aislada recientemente de un paciente. Para estudiar posibles comunidades antigénicas se utilizaron además cepas de: *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans A*, *Cladosporium carrionii*, *Cryptococcus neoformans*, *Emmonsia crescens*, *E. parva*, *Epidermophyton floccosum*, *Monosporium apiospermun*, *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *Phialophora verrucosa*, *Trichophyton terrestre y T. violaceum*, conservadas en la micoteca de los Laboratorios de Parasitología de Lille.

Cultivos

En el caso de *P. brasiliensis* se efectuaron cultivos estacionarios en caldo Sabouraud, a partir de colonias de 10 días de la forma miceliar (forma M) y de la forma levadura (forma L) de cada cepa, obtenidas en agar Sabouraud. La incubación en medio líquido se efectuó a 24°C (forma M) y a 37°C (forma L) durante 3 meses.

Los demás mohos y levaduras seleccionados para estudio de comunidades antigénicas se cultivaron de acuerdo a las recomendaciones de Biguet *et al* (1965) preparando los extractos según lo sugieren los mismos autores.

Preparación de los antígenos

Cumplidos los 3 meses de crecimiento se prepararon extractos "somáticos", "metabólicos", "mixtos" y "frescos" de las formas M y L de *P. brasiliensis*.

Para la obtención de los antígenos "somáticos" y "metabólicos" se adoptó estrictamente el procedimiento aconsejado por Biguet *et al* (1969). Luego de la liofilización, los 9 extractos "somáticos" y los 9 "metabólicos" de la forma M fueron mezclados, originando el antígeno "mixto M"; lo mismo se realizó con la forma L, preparando así el extracto "mixto L". La mezcla por partes iguales de los extractos "mixtos" M y L dio origen al antígeno "total".

Para la preparación de extractos "frescos", destinados a la investigación de actividades enzimáticas, se procedió de la siguiente manera: después de un mes de cultivo a 24°C el micelio fue separado, porfiltración, del caldo de cultivo, suspendido en NaCl al 1%o, y sometido a trituración mecánica y homogeneización en ambiente refrigerado. Posteriormente se centrifugó la suspensión de micelio triturado, mezclando el sobrenadante con el caldo de cultivo, y dializando la solución resultante primero contra agua destilada (24 horas) y luego contra una solución de polivinilpirrolidona a 40g% en tampón Veronal sódico pH 8.2, hasta obtener un volumen final 60 veces menor.

*Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

**Central Bureau voor Schimmelcultures. Baarn, Holanda (Cepa mantenida en la micoteca de Lille, desde 1962).

***Laboratorio de Inmunología Parasitaria, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.



Sueros hiperinmunes

Se prepararon en 4 conejos combinando las dos técnicas recomendadas por Biguet *et al* (1967).

a. inyección subclavicular de 4 mg. de antígeno "total" (2 mg. de extracto "mixto M" más 2 mg. de extracto "mixto L"), disueltos en 0·5 ml. de solución de NaCl al 0·9%o, y luego colocado en emulsión con 0·5 ml. de adyuvante completo de Freund;

b. inoculación simultánea, por vía subcutánea de 0·5 ml. de una suspensión en NaCl al 0·9%o de células dilaceradas de *P. brasiliensis* junto a 0·5 ml. de adyuvante incomplento de Freund, con el fin de que los constituyentes antigénicos insolubles del hongo intervengan en la inmunización.

Estas inyecciones fueron reiteradas semanalmente durante 5 semanas, al cabo de las cuales se suspendieron durante 15 días, para reiniciarlas luego hasta completarle serie de 15 inyecciones.

Enfermedad experimental

Se inocularon 2 hamsters y 3 conejos con la forma levadura de *P. brasiliensis*. Los hamsters recibieron 0·5 ml. i/p de una suspensión en suero fisiológico conteniendo aproximadamente 8×10^6 de levaduras/ml de la cepa IHM 1572 (estimación por recuento microscópico en cámara cuenta-glóbulos tipo Neubauer), incubada 10 días en agar Sabouraud, a 37°C. Fueron sangrados cada 15 días a partir del momento de la inoculación.

Los conejos, albinos, de 6 meses de edad, fueron inoculados por vía i/v con 0·5 ml. de una suspensión en suero fisiológico conteniendo aproximadamente 25000 levaduras/ml, de la cepa LIP 70·159, incubada 10 días en agar Sabouraud a 37°C. Se les extrajo sangre semanalmente durante el primer mes, y cada 30 días a partir de la 4a. semana de infección.

Las muestras de suero fueron conservadas con Merthiolate (R) al 1×10^4, a –20°C, hasta el momento de su estudio (No fueron inactivadas).

Sueros Humanos

Se obtuvieron de 30 pacientes afectados por diferentes formas clínicas de paracoccidioidomicosis con confirmación micológica. Estos sueros fueron conservados en las mismas condiciones que los de origen animal.

Técnicas

a. Electroforesis de los extractos antigénicos. Se efectuó en agar Behringwerke(R) al 1%, en tampón veronal pH 8·4 0·05 M para las láminas, y veronal pH 8·4 0·025 M, para la cuba, de acuerdo a lo propuesto por Wieme (1965).

b. Doble difusión en gel, según Ouchterlony (1948), utilizando agarosa al 0·9% como soporte, antígenos a una concentración de 200 mg/ml, y sueros concentrados a la mitad de su volumen inicial.

c. Inmunoelectroforesis: se empleó el procedimiento descrito por Biguet *et al* (1965).

d. Revelación actividades enzimáticas: se aplicaron los métodos utilizados por Uriel (1963) y Tran Van Ky *et al* (1969, 1970).

En las pruebas de doble difusión e inmunoelectroforesis se empleó como antígeno el extracto "total"; la actividad enzimática se investigó en extractos "frescos" de *P. brasiliensis*.

Resultados

Electroforesis

La migración electroforética en agar del extracto "total" de *P. brasiliensis* permitió individualizar 8 fracciones, que se separaron en base a su diferente movilidad. Tres de ellas se desplazaron hacia el cátodo, y cinco hacia el ánodo (fig. 1a).



Las técnicas de revelación enzimática demostraron la existencia de 15 enzimas en esos extractos (fig. 1b): dos glucuronidasas (G1 y G2), dos quimotripsinas (Q2 y Q3), una esterasa (E), una fosfatasa alcalina (F Alc 2), y una leucil-amino-peptidasa (LAP) en posición anódica; una fosfatasa alcalina (F alc 1), una quimotripsina (Q1), una esterasa (E 1), una fosfatasa ácida (F ac), una catalasa (C), una amilasa (A), y un

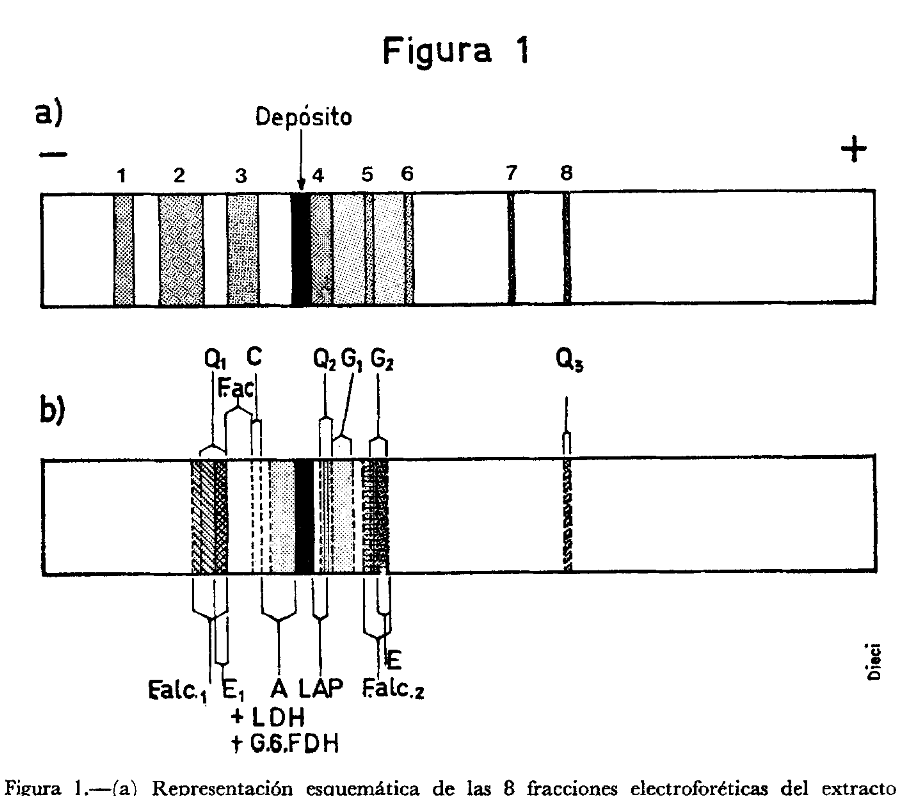


Figura 1.—(a) Representación esquemática de las 8 fracciones electroforéticas del extracto soluble "total" de 9 cepas de *P. brasiliensis*. Zonas inter 4-5 y 5-6 deposito impreciso de proteinas.
(b) Distribución de las actividades enzimáticas reveladas en el electroforegrama del extracto "fresco" de las mismas cepas de *P. brasiliensis*.
F. alc.: fosfatasa alcalina; Q: quimotripsina; E: esterasa; F. ac.: fosfatasa ácida; C: catalasa; LDH: láctico dehidrogenasa; GGFDH: glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa; A: amilasa; LAP: leucil-amino-peptidasa; G: glucuronidasa;

grupo de proteínas aún mal definidas con actividad láctico-dehidrogenasa (LDH) y glucosa-6-fosfato-dehidroge-nasa (G 6 FDH), en posición catódica.

Comunidades Antigenicas

Enfrentando sueros hiperinmunes anti-*P. brasiliensis* a los demas antígenos preparados, en láminas de doble difusión, se demostró que algunas de las fracciones antigénicas de *P. brasiliensis* están presentes en extractos solubles de especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Cryptococcus* y *Emmonsia* (Cuadro), pero en ningún caso apareció involucrada en estas reacciones cruzadas la fracción catódica dotada de actividad fosfatasa alcalina. Por inmunoelectroforesis se determinó que las fracciones comunes entre *Paracoccidioides* y *Emmonsia* llegan por lo menos al número de 7.



Especies	*Fracciones communes*
Aspergillus fumigatus	1
Candida albicans A	0
Cladosporium carrionii	0
Cryptococcus neoformans	1
Emmonsia crescens	3 a 4
E. parva	3
Epidermophyton floccosum	0
Monosporium apiospermum	0
Penicillium digitatum	0
P. italicum	0
Phialophora verrucosa	0
Trichophyton terrestre	0
T. violaceum	0

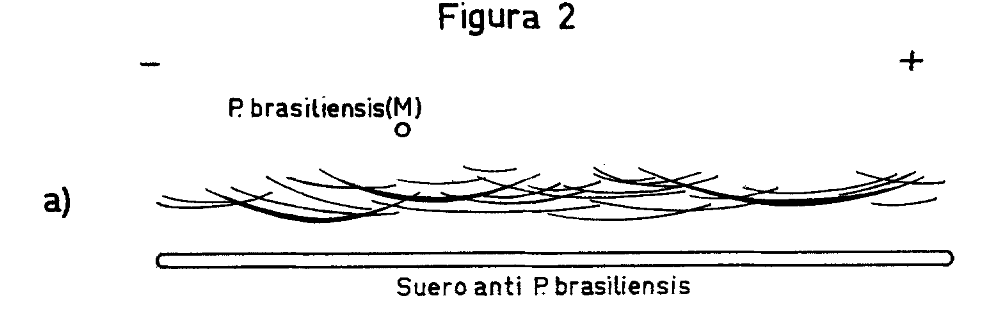
CUADRO.—COMUNIDADES ANTIGENICAS DE *P. brasiliensis* CON DIVERSOS HONGOS Y LEVADURAS, REVELADAS MEDIANTE DOBLE DIFUSION EN GEL.

Diagramas Inmunoelectroforéticos

La inmunoelectroforesis se aplicó al análisis de los extractos antigénicos "totales" de *P. brasiliensis* utilizando sueros hiperinmunes y sueros de casos humanos.

La superposición esquemática de todos los sistemas precipitantes revelados mediante los 4 hiperinmunosueros de conejo (fig. 2A), constituye el diagrama inmuno-

Figura 2



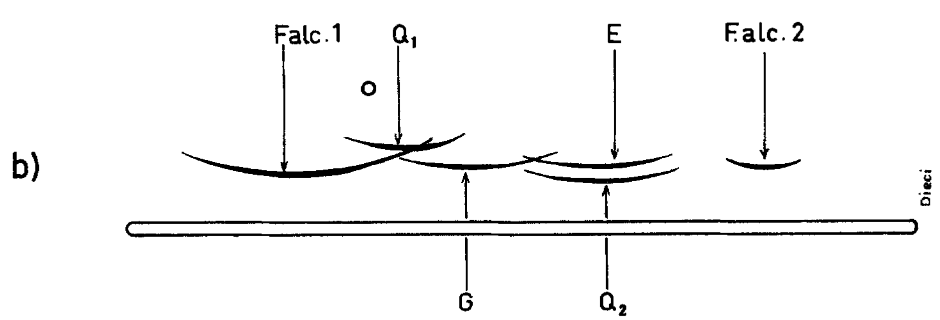


Figura 2.—(a) Disposición inmunoeléctroforética de las 25 fracciones antigénicas reveladas en extracto "total" de *P. brasiliensis*, por medio de sueros hiperinmunes de conejo.
(b) Sistemas precipitantes portadores de actividad enzimática. Antígeno "fresco" analizado por sueros hiperinmunes de conejo.



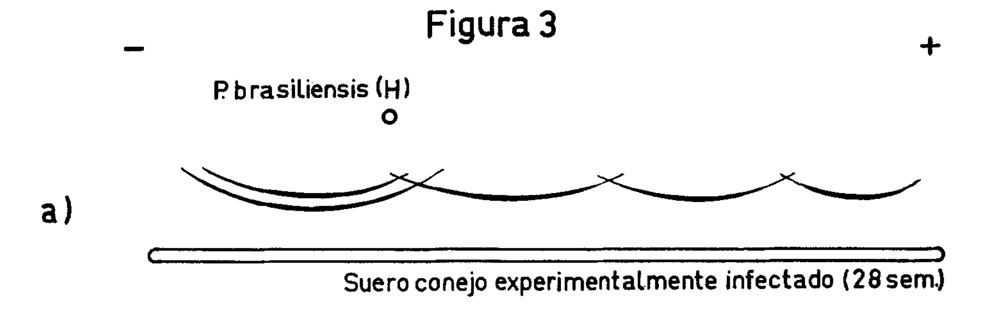
electroforético teórico actual de *P. brasiliensis*. Está compuesto por 25 arcos de precipitación, dispuestos en su mayoría en el sector anódico de las láminas.

La aparición de anticuerpos precipitantes en forma de brotes masivos, impidió la determinación de una curva que represente la evolución de estos anticuerpos en el curso de la inmunización. Se pudo determinar, sin embargo, que el anticuerpo correspondiente a la fracción de movilidad catódica, portadora de actividad fosfatasa alcalina, aparece 3 semanas después de la primera inyección de antígeno. La hiperinmunización se logró, en los 4 animales, después de la 14a. semana de inmunización.

Las técnicas de revelación de actividades enzimáticas pusieron en evidencia sólo 6 enzimas cuando se emplearon sobre los diagramas inmunoelectroforéticos (fig. 2b); una fosfatasa alcalina (F alc 1), de movilidad catódica; dos quimotripsinas (Q1 y Q2), una glucuronidasa (G), una esterasa carboxílica débil (E), y una fosfatasa alcalina (F alc 2), éstas últimas de movilidad anódica.

Evolución de los Anticuerpos en la Enfermedad Experimental

Se estudió analizando inmunoelectroforéticamente las muestras de suero extraídas de animales experimentalmente infectados, ante extractos "totales" de *P. brasiliensis*. Este procedimiento demostró anticuerpos precipitantes circulantes a las 5 semanas de infección en los conejos, y a las 6 semanas en los hamsters. En ambos casos el primer anticuerpo identificable resultó ser el correspondiente a la fracción catódica dotada de actividad fosfatasa alcalina. En el momento de escribir este artículo los animales cursan el 11° mes de infección, habiéndose llegado al máximo de anticuerpos circulantes (5 sistemas precipitantes) al 7° mes (fig. 3A.)



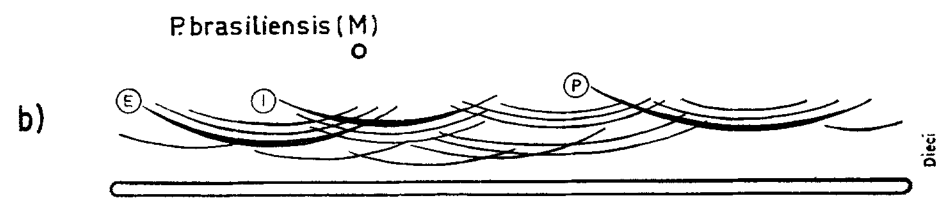


Figura 3.—(a) Ubicación inmunoelectroforética de los anticuerpos precipitantes anti-*P. brasiliensis* demostrados en el suerode un conejo al cabo de 28 semanas de infección experimental. (b) Superposición esquemática de las 19 fracciones del mosaico antigénico de *P. brasiliensis* reveladas por los sueros de 29 enfermos con paracoccidioidomicosis. Con las letras E, I y P se señalan los arcos "mayores" del diagrama.



Anticuerpos Precipitantes en la Paracoccidioidomicosis Humana

Las muestras de suero de los 30 pacientes de paracoccidioidomicosis fueron sometidas a análisis inmunoelectroforético frente a extracto "total" de *P. brasiliensis,* veintinueve de ellas originaron arcos de precipitación, en número variable entre 1 y 13. En todos los casos reactivos fue posible individualizar el complejo antígeno-anticuerpo de movilidad catódica (arco E), integrado por la fracción antigénica portadora de actividad fosfatasa alcalina (F alc 1).

La superposición esquemática de todos los sistemas precipitantes revelados en los sueros humanos (fig. 3b) origina un diagrama teórico enteramente comparable al de los sueros hiperinmunes de conejo, y permite identificar 19 de las 25 fracciones hasta ahora individualizadas en los extractos solubles de *P. brasiliensis.* El extracto metabolico de la forma M del hongo resulto el más conveniente para la revelación del anticuerpo correspondiente al arco E, en sueros de origen humano (fig. 4 a y b).

Discusion

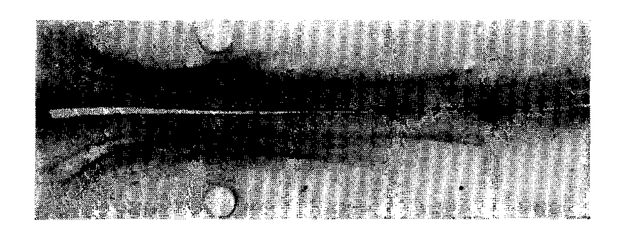
Los resultados relatados demuestran que *P. brasiliensis* está compuesto por un elevado número de fracciones antigénicas solubles. Pese a que comparte algunas de ellas con *H. capsulatum, H. duboisii,* y *B. dermatitidis,* su "mosaico" es notablemente original, permitiendo la identificación de la especie.

En efecto, el presente estudio ha confirmado que *P. brasiliensis,* a diferencia de los otros agentes de micosis profundas hasta ahora estudiados (Vaucelle, 1969), posee fracciones antigénicas solubles que se desplazan hacia el cátodo cuando son sometidas a la acción de un campo eléctrico a pH alcalino. Por otra parte, la investigación de actividades enzimáticas en extractos solubles del agente de la paracoccidioidomicosis ha permitido individualizar 15 enzimas cuya distribución electroforética parece ser constante y característica. En los inmunoelectroforegramas sólo fue posible revelar 6 de esas enzimas, lo que se explicaría, sea porque el complejo antígeno-anticuerpo correspondiente a las 9 restantes no se forma (el suero es poco inmune o la fracción no es antigénica), sea porque la unión antígeno- anticuerpo inactiva las enzimas actuando en el sitio activo, directamente o por inhibición alostérica. La acción patógena del hongo parecería estar inter-relacionada con su actividad enzimática. Albornoz y Campo (1971) han comprobado recientemente que dos de las enzimas identificadas en *P. brasiliensis,* la fosfatasa alcalina y la leucil-amino-peptidasa, son producidas *in vivo* e *in vitro* por la forma parasitaria del hongo. Su demostración resultó imposible en levaduras extraídas de individuos tratados con anfotericina B, lo que sugiere que serían inactivadas ó destruídas por la droga.

La fracción de movilidad catódica dotada de actividad fosfatasa alcalina es una de las más antigénicas, habiendo sido revelada por sueros extraídos precozmente de conejos en vías de inmunización (3a. semana), y de animales recientemente infectados (5a–6a semana). El arco de precipitación que origina en los inmunoelectroforegramas es de forma y topografía constantes, resultando enteramente similar al arco E (Yarzábal, 1971) identificado en 29 de los 30 sueros de casos humanos de paracoccidioidomicosis incluídos en este trabajo.

De confirmarse estos resultados, el diagnóstico inmunológico de la paracoccidioidomicosis adquirirá gran seguridad, y podrá contribuír al mejor conocimiento de las formas iniciales de la enfermedad. Hasta ahora, si bien se disponía de pruebas inmunológicas suficientemente sensibles (Fava-Netto, 1961; Restrepo, 1966), era indiscutible el riesgo de aparición de resultados positivos falsos sobre todo ante títulos bajos en la fijación de complemento, o ante reacciones débiles en la prueba de doble





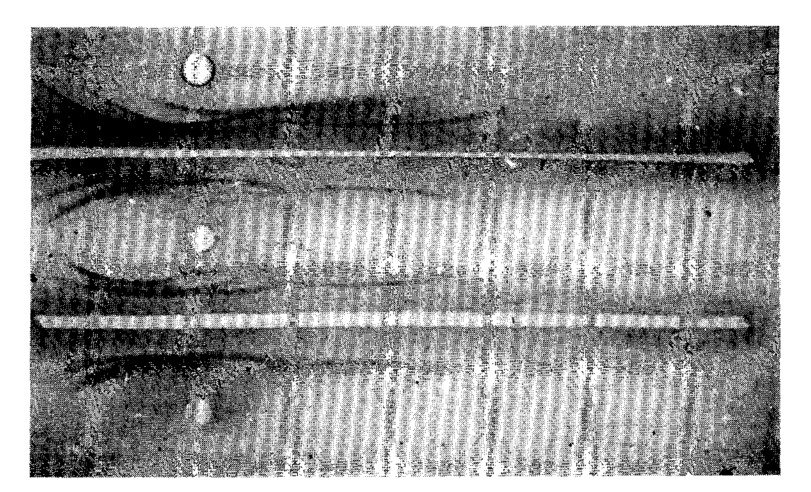


Figura 4.—(a) Análisis inmunoelectroforético de extractos antigénicos "somatico" (orificio superior) y "metabolico" (orificio inferior) de la forma M de *P. brasiliensis*, mediante suero de un caso humano de paracoccidioidomicosis (hendidura central).
Obsérvese la nitidez del arco mayor de migración catódica obtenido con el antígeno "metabólico".
(b) Análisis inmunoelectroforético de extractos "metabólico" (orifico superior), "total" (orificio central) y "somatico" (orificio inferior), de la forma M de *P. brasiliensis*, mediante suero de otro paciente de paracoccidioidomicosis (hendiduras).

(*To face page* 86

difusión, que podían corresponder a reacciones cruzadas. La individualización, a nivel del mosaico antigénico de *P. brasiliensis,* de una fracción mayor, dotada de actividad enzimática característica, que no resulta afectada por reacciones cruzadas, y que es revelada por la enorme mayoría de los sueros humanos reactivos, reducirá seguramente el índice de inespecificidad del inmunodiagnóstico de la micosis.

El parentesco antigénico observado entre *P. brasiliensis* y dos especies del género *Emmonsia,* coincide con lo subrayado por Le Fichoux, Andrieu y Biguet en el V° Congreso de la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal (Paris, julio de 1971), sugiriendo una posible vinculación entre el género *Emmonsia* y la familia de las *Gymnoascaceae.*

En lo que respecta a la antigenicidad de las distintas cepas de *P. brasiliensis* el presente estudio permitió observar sensibles diferencias, aunque no fue planificado con esa finalidad. Analizando las cepas empleadas en forma aislada frente a un suero hiperinmune de conejo se comprobó que las más antigénicas eran la IHM 891, IHM 1437 y la IHM 1572. Esto contrasta con la notable constancia que caracteriza a los lotes de antígenos extraídos de diferentes cepas de *H. capsulatum* o de *B. dermatitidis,* pero concuerda con los hallazgos efectuados por Silva *et al* (1968) mediante el uso de la prueba de anticuerpos fluorescentes, y con los obtenidos por Restrepo (1971) empleando la doble difusión en gel. Las diferencias antigénicas observadas indican que la estandarización de los antígenos de *P. brasiliensis* es tan imprescindible como la uniformización de las técnicas, para obtener resultados comparables en el inmunodiagnóstico de la paracoccidiodomicosis.

La prolongada conservación en colección no parece afectar grandemente la capacidad antigénica de las cepas dado que las dos más antiguas de las utilizadas (CBS e IHM 891) proporcionaron extractos de muy buena calidad.

Summary

Agar gel electrophoresis of soluble extracts obtained from 9 cultures of *Paracoccidioides brasiliensis,* in alkaline pH, revealed 8 protein fractions, 5 aniodic and 3 cathiodic. Electrophoregrams revealed 15 enzymes, only 6 of which were further identified on immunoelectrophoregrams.

Immunoelectrophoretic analysis of the extracts with hyperimmune serum prepared in rabbits confirmed that *P. brasiliensis* has a minimum of 25 antigenic fractions. One of them of cathodic mobility with alkaline phosphatase activity, reacted with all immune sera employed and thereby produced a characteristic antigen antibody system. An antibody corresponding to this fraction was formed early during the experimental infection of rabbits. This suggested that the antigen involved in the formation of arc E, was specific in human paracoccidioidomycosis. The existence of various antigenic fractions common to *P. brasiliensis* and species of *Emmonsia* was verified.

Bibliografia

Albornoz, Maria B. de & Campo Aasen, I. (1971), Estudio citoquímico de las principales enzimas hidrolíticas del *Paracoccidioides brasiliensis. Sabouraudia,* **6,** 139-143.

Andrieu, Suzanne, Biguet, J., Dujardin, L. & Vaucelle, There (1969). Etude antigenique des agents des mycoses profondes par l'analyse comparée des milieux de culture. I *Histoplasma capsulatum* et *H. duboisii.* Relations avec *H. farciminosum, Gymnoascus demonbreunii, Blastomyces dermatitidis* et *Paracoccidioides brasiliensis. Mycopathologia et Mycologia applicata,* **39,** 97-108.

Biguet, J., Tran van Ky, P., Andrieu, Suzanne & Fruit, J. (1965). Analyse immunoélectrophorétique des antigenes fongiques et systématique des champignons. Répercussions pratiques sur le diagnostic des mycoses. *Mycopathologia et Mycologia applicata,* **26,** 241-256.

Biguet, J., Tran van Ky, P., Andrieu, Suzanne & Vaucelle, Therese (1967). Premieres caractérisaations d'activités enzymatiques sur les immunoélectrophorégrammes des extraits antigéniques de *Histoplasma capsulatum.* Conséquences diagnostiques pratiques. *Annales Société Belge Medecine tropicale,* **47,** 425-434.



BIGUET, J., FRUIT, J., ANDRIEU, SUZANNE & TRAN VAN KY, P. (1969). Structure antigénique et systématique des especes du genre *Aspergillus*. *Bulletin de la Société Mycologique de France,* **85,** 273-284.

FAVA-NETTO, C. (1961). Contribuicao para o estudo immunologico da Blastomicose de Lutz. *Revista de Instituto Adolfo Lutz* (Sao Paulo), èö**,** 99-124.

GARDINI, N. E. (1966). Relaciones biológicas entre *Paracoccidioides, Blastomyces* e *Histoplasma*. *Anales de la Facultad de Medicina de Lima,* **49,** 80-108.

OUCHTERLONY, O. (1948). *In vitro* methods for testing the toxin-producing capacity of Diphtheria bacteria. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinava,* **25,** 186-191.

RESTREPO, ANGELA (1966). La prueba de immunodifusión en el diagnóstico de la paracoccidioidomicosis. *Sabouraudia,* **4,** 223-230.

RESTREPO, ANGELA (1970). Serological comparison of the two morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infection and Immunity,* **2,** 268-273.

RESTREPO, ANGELA & DROUHET, E. (1970). Etude des anticorps précipitants dans la blastomycose Sud-Américaine par l'analyse immunoélectrophorétique des antigenes de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Annales de l'Institut Pasteur,* Paris, **119,** 338-346.

SILVA, M. E., KAPLAN, W. & MIRANDA, J. L. (1968). Antigenic relationships between *Paracoccidioides loboi* and other pathogenic fungi determined by immunofluorescence. *Mycopathologia et Mycologia applicata,* **36,** 97-106.

TRAN VAN KY, P., VAUCELLE, THERE, ANDRIEU, SUZANNE, TORCK, C. & FLOCH, F. (1969). Caractérisation de complexes enzymes-antienzymes dans les extraits de levures du genre *Candida* apres immunoélectrophorégramme en agarose. *Mycopathologia et Mycologia Applicata,* **38,** 345-357.

TRAN VAN KY, P., URIEL, J. & ROSE, F. (1970). Caracterisations des types d'activités enzymatiques dans les extraits antigéniques d'*Aspergillus fumigatus* apres électrophorese et immunoélectrophorese en agarose. *Annales d l'Institut Pasteur,* **3,** 162-170.

URIEL, J. (1963). Characterisation of enzymes in specific immunoprecipitates. *Annales of the New York Academy of Science,* **103,** 956-979.

VAUCELLE, THERESE (1969). Contribution a l'étude immunologique des histoplasmoses. Thèse Pharmacie, Lille.

WIEME, R. J. (1965). Agar-gel electrophoresis. *Elsevier Publishing Co.,* New York.

YARZABAL, L. A. (1971). Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomicosis sudamericana, revelados por inmunoelectroforesis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo,* öà**,** 320-327.

YARZABAL, L. A., TORRES, J. M., VIGNA, I., DA LUZ, S. & ANDRIEU, SUZANNE (1971). Mosaico antigénico de *Paracoccidioides brasiliensis*. Primer Simposio Panamericano sobre Paracoccidioidomicosis. Medellín (Colombia), 25-27 deoctubre.

